



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia

Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**Sistemi termosensibili gelificanti in situ a base di
chitosano e derivati contenenti nanoparticelle
medicate per la somministrazione
transcorneale di 5-fluorouracile**

Relatori

Dott.ssa Ylenia Zambito

Dott.ssa Angela Fabiano

Candidato

Mariateresa Maggio

Anno Accademico 2013/2014

Alla mia famiglia

Indice

Capitolo 1

Introduzione	1
1.1 Idrogeli chitosano/β-Glicerofosfato contenenti nanoparticelle medicate	2
<i>1.1.1 Idrogeli</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Nanoparticelle</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Chitosano.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.4 β-Glicerofosfato.....</i>	<i>6</i>
1.2 Metodi di preparazione di idrogeli chitosano/β-Glicerofosfato	7
1.3 Applicazione di idrogeli chitosano/β-Glicerofosfato.....	9
<i>1.3.1 Somministrazione orale.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2 Ingegneria tissutale</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3 Terapia antitumorale.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3.1 5-Fluorouracile</i>	<i>11</i>
1.4 Metodi di preparazione di nanoparticelle di chitosano.....	13
<i>1.4.1 Reticolazione ionotropica.....</i>	<i>13</i>
<i>1.4.2 Coacervazione complessa</i>	<i>14</i>
<i>1.4.3 Microemulsione</i>	<i>14</i>
<i>1.4.4 Coalescenza di goccioline in emulsione.....</i>	<i>15</i>

1.4.5 Estrazione del solvente in emulsione	16
1.4.6 Auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente	16
1.5 Liofilizzazione di dispersioni nanoparticellari.....	17
1.6 Vantaggi del chitosano nella somministrazione oculare	19
 Capitolo 2	
Parte sperimentale	21
 2.1 Materiali e metodi	23
2.1.1 Materiali	23
2.1.2 Depolimerizzazione di HA.....	24
2.1.3 Determinazione viscosimetrica del peso molecolare di rHA e chitosano commerciale.....	25
2.1.4 Sintesi dei coniugati N^+Ch	26
2.1.5 Attacco covalente di gruppi tiolici sui derivati N^+Ch	27
2.1.6 Determinazione del contenuto di gruppi tiolici.....	28
2.1.7 Preparazione di idrogeli termosensibili.....	28
2.1.8 Preparazione di nanoparticelle medicate con 5-FU.....	30
2.1.10 Determinazione HPLC di 5-FU	31
2.1.11 Studio delle interazioni farmaco-polimero in fase semisolida.....	32
2.1.12 Studio del rilascio di 5-FU dagli idrogeli, in presenza e in assenza di nanoparticelle	33
 2.2 Risultati e discussioni.....	33

<i>2.2.1 Sintesi dei coniugati N⁺Ch</i>	<i>33</i>
<i>2.2.2 Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N⁺Ch</i>	<i>34</i>
<i>2.2.3 Caratterizzazione delle nanoparticelle medicate con 5-FU ...</i>	<i>35</i>
<i>2.2.4 Studio delle interazioni farmaco-polimero in fase semisolida</i>	<i>36</i>
<i>2.2.5 Rilascio di 5-FU dagli idrogeli in presenza e in assenza di nanoparticelle</i>	<i>37</i>

Capitolo 3

Conclusioni	39
Figure e tabelle	41
Bibliografia	47

Capitolo 1

Introduzione

Negli ultimi anni, numerosi studi sono stati dedicati allo sviluppo di nuovi sistemi di rilascio oculare di farmaci allo scopo di prolungare il tempo di residenza oculare dei farmaci stessi, minimizzandone la frequenza della dose e aumentandone la penetrazione transcorneale. La biodisponibilità di farmaci oculari, somministrati mediante tradizionali gocce oftalmiche, è scarsa poiché l'area precorneale, che è il principale sito di azione/assorbimento dei farmaci, è soggetta ai naturali meccanismi protettivi dell'occhio quali lacrimazione, ammiccamento delle palpebre e drenaggio naso-lacrimale. Infatti, il tempo di residenza della maggior parte delle soluzioni convenzionali oculari è compreso nell'intervallo 5-25 minuti e solo l'1-10% della dose applicata viene assorbita, la quale include anche assorbimento nel tratto gastrointestinale a causa del drenaggio attraverso il dotto naso-lacrimale. Come risultato, si ha la necessità di frequenti instillazioni che comportano effetti collaterali locali, quali mal di testa a causa dello spasmo del muscolo ciliare, miosi e miopia accomodativa (*M. A. Kass et al., 1986.*). Pertanto, sistemi di rilascio oculare sono stati sviluppati allo scopo di superare questi ostacoli e aumentare la biodisponibilità di farmaci oculari. In particolare, idrogeli contenenti nanoparticelle hanno assunto particolare attenzione come uno

dei più promettenti sistemi nanoparticellari di rilascio dei farmaci grazie alle loro caratteristiche di idrogeli (e.g., idrofilicità e alto contenuto di acqua) unite alle caratteristiche delle nanoparticelle (e.g., dimensioni molto piccole).

1.1 Idrogeli chitosano/ β -Glicerofosfato contenenti nanoparticelle medicate

Sistemi di rilascio di farmaci gelificanti in situ che esibiscono una transizione di fase dovuta a cambiamenti fisico-chimici dell'ambiente circostante, possono essere instillati come gocce liquide nel cul-de-sac dell'occhio dove si trasformano in gel o fasi semisolide. Dunque, offrono il vantaggio di una facile somministrazione combinata a un aumento del tempo di ritenzione dovuto alla formazione del gel.

Idrogeli contenenti nanoparticelle hanno le caratteristiche sia degli idrogeli sia delle nanoparticelle. Dunque, il vantaggio maggiore è rappresentato da idrofilicità, flessibilità, biocompatibilità e alto contenuto di acqua, combinati con tutti i vantaggi delle nanoparticelle, principalmente lunga durata di azione e possibilità di essere indirizzate attivamente o passivamente al desiderato sito bersaglio, e.g., sito tumorale, superficie oculare etc.

1.1.1 Idrogeli

Gli idrogeli, per definizione, sono reticoli polimerici tridimensionali capaci di assorbire considerevoli percentuali di acqua o fluidi biologici senza che ciò comporti una loro dissoluzione. Da un punto di vista generale, gli idrogeli possono essere classificati secondo una grande varietà di caratteristiche come la natura dei gruppi sostituiti sulle catene polimeriche (neutri o ionici), il metodo di preparazione (omo- o copolimeri), la natura fisica (amorfi, semicristallini, idrocolloidi), e la risposta agli stimoli dell'ambiente fisiologico (pH, forza ionica, temperatura, radiazioni elettromagnetiche, etc.). I polimeri comunemente usati nella preparazione di idrogeli per applicazione biologica o farmaceutica sono di origine naturale o sintetica. Gli idrogeli di origine naturale sono non tossici, biocompatibili e mostrano particolari proprietà chimico-fisiche che li rendono adatti come sistemi di rilascio di farmaci. La capacità degli idrogeli di assorbire acqua è attribuita alla presenza di gruppi idrofili, quali $-OH$, $-CONH-$, $-CONH_2$ e $-SO_3H$ sulle strutture polimeriche formanti gli idrogeli. Inoltre, alcuni fattori quali temperatura, pH, campo elettrico e magnetico, biomolecole provocano una transizione di fase dovuta a interazioni molecolari con conseguente cambiamento nella struttura tridimensionale come rigonfiamento, collasso e transizione sol-gel.

Grazie a queste caratteristiche, gli idrogeli sono candidati ideali in campo biomedico.

1.1.2 Nanoparticelle

Le nanoparticelle sono particelle solide colloidali con diametro da 10 a 1000 nm. Si distinguono in *nanosfere* e *nanocapsule*: le prime hanno una struttura monolitica con il farmaco disperso nella matrice polimerica o adsorbito sulla superficie; le altre presentano una membrana esterna e in questo caso il farmaco può essere intrappolato nel nucleo o adsorbito sulla superficie esterna. La matrice polimerica può avere origine naturale o sintetica; i polimeri naturali sono preferiti grazie alla loro mucoadesività, biocompatibilità e relativa non tossicità.

1.1.3 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride costituito essenzialmente da unità di glucosammina e basse percentuali di unità di N-acetilglucosammina, unite da legami β (1 - 4) (*Peniche and Peniche 2011*).

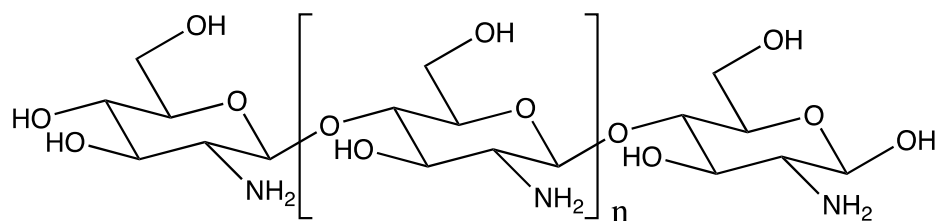


Figura 1: Struttura del chitosano

Il chitosano si trova raramente in natura ed è generalmente ottenuto per deacetilazione della chitina, un omopolimero di N-acetil-D-glucosammina unite da legami β (1 - 4) presente nel guscio di crostacei e molluschi, nella parete cellulare dei funghi e nella cuticola degli insetti.

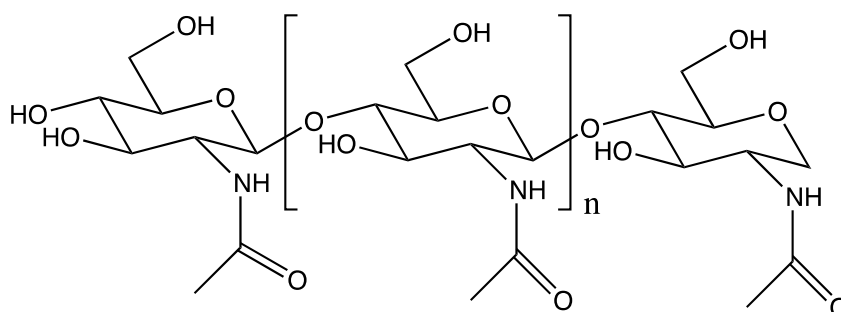


Figura 2: Struttura chitina

La microstruttura del chitosano influenza le proprietà del polimero stesso e dipende dalle condizioni in cui è effettuata la reazione di deacetilazione: in condizioni eterogenee si ottiene un chitosano insolubile in acqua ma solubile a pH acido, al contrario la deacetilazione omogenea della chitina produce un chitosano solubile in acqua. Il chitosano è disponibile in una vasta gamma di pesi molecolari e gradi di acetilazione; inoltre può essere modificato chimicamente intervenendo sui gruppi -NH_2 e -OH per generare derivati utili per lo sviluppo di nuove formulazioni.

Il chitosano è biocompatibile, biodegradabile, non tossico e mucoadesivo, caratteristiche che lo rendono interessante per applicazioni in campo medico e farmaceutico. Aumenta la permeabilità delle membrane cellulari, è un promotore di assorbimento perché prolunga il tempo di residenza dei sistemi di rilascio al sito di assorbimento ed è in grado di aprire le giunzioni strette delle membrane cellulari. Inoltre mostra attività antimicrobica, antivirale, antitumorale e immunoadiuvante.

1.1.4 β -Glicerofosfato

Il β -Glicerofosfato (β -GP) è un composto organico naturalmente presente nel corpo; è generalmente usato come fonte di fosfato nel trattamento di disfunzioni metaboliche e la sua somministrazione parenterale è stata approvata dalla FDA.

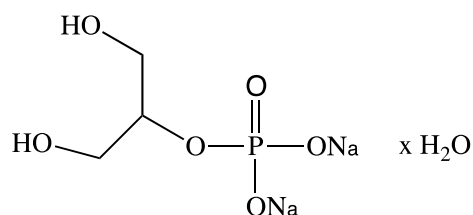


Figura 3: Struttura Glicerofosfato sale disodico

Il β -Glicerofosfato è anche usato come catalizzatore della transizione sol-gel in soluzioni di chitosano a pH e temperatura fisiologici.

1.2 Metodi di preparazione di idrogeli chitosano/ β -Glicerofosfato

Crosslinking mediante irradiazione ultravioletta:

Questo metodo riportato per la prima volta da *Ono et al., 2000*, prevede l'introduzione di molecole di lattosio nel chitosano al fine di aumentare la sua solubilità a pH neutro e di un'azide fotoreattiva che provochi la formazione del gel grazie all'interazione dei gruppi azidici con i gruppi amminici. La soluzione così ottenuta viene esposta a radiazione ultravioletta (UV) in modo da formare un gel insolubile ed adesivo.

Crosslinking mediante aumento di pH e temperatura:

Il chitosano si scioglie in ambiente acido attraverso la protonazione dei suoi gruppi amminici. Una volta disciolto, rimane in soluzione a un valore di pH di circa 6.2. La neutralizzazione di soluzioni acquose di chitosano provoca la formazione di un precipitato idrogel-simile ed è stata riportata per la prima volta da *Chenite et al., 2001*. Secondo questi autori, le soluzioni di chitosano, in presenza di β -Glicerofosfato (β -GP), rimangono liquide a temperatura ambiente anche quando il pH raggiunge la neutralità. Questo sistema è termicamente sensibile e gelifica alla temperatura corporea (*Ruel-Gariépy et al., 2004*).

Il β -GP svolge tre ruoli importanti in questo sistema:

1. Provoca un aumento del pH al range fisiologico di 7.0-7.4;
2. Previene l'immediata precipitazione o gelificazione;
3. Controlla la formazione del gel all'aumentare della temperatura.

La transizione sol-gel è pH sensibile e il tempo di gelificazione è temperatura-dipendente.

Il meccanismo molecolare di gelificazione può includere svariate interazioni tra chitosano, β -GP e acqua (*Cromton et al., 2005; Ruel-Gariépy, Chaput, Guirguis, & Leroux, 2000*). Le effettive interazioni responsabili della transizione sol-gel sono:

- aumento dei legami idrogeno intercatena come conseguenza della riduzione della repulsione elettrostatica dovuta all'azione basica del sale;
- attrazione elettrostatica chitosano- β -Glicerofosfato tra i gruppi ammonio ed i gruppi fosfato, rispettivamente;
- interazioni idrofobiche chitosano-chitosano.

La formazione degli idrogeli chitosano/ β -GP dipende dalla concentrazione sia del chitosano che del β -GP (*Cho, Heuzey, Bégin, & Carreau, 2006*). Il pH delle soluzioni di chitosano aumenta all'aumentare della concentrazione di β -GP grazie all'effetto neutralizzante dei gruppi

fosfato. L'aumento della temperatura, invece, non influenza il pH del sistema chitosano/ β -GP, ma ha effetto sulla formazione del gel poiché provoca un aumento della forza ionica.

Recentemente, *Buschmann et al.*, hanno dimostrato che la transizione sol-gel avviene attraverso due step. Inizialmente, il chitosano viene parzialmente neutralizzato e portato alla vicina precipitazione mediante l'aggiunta di una base debole quale β -GP. Successivamente, la soluzione viene riscaldata ed il chitosano rilascia i suoi protoni. Se la quantità di fosfato è tale da accettare questi protoni, il loro trasferimento provoca la precipitazione del chitosano e induce la transizione sol-gel.

1.3 Applicazione di idrogeli chitosano/ β -Glicerofosfato

Il rilascio dei farmaci dagli idrogeli avviene grazie alla diffusione attraverso la loro struttura porosa. Le loro caratteristiche biochimiche e la loro struttura tridimensionale li rendono candidati ideali in svariati campi biomedici.

1.3.1 Somministrazione orale

La somministrazione orale provoca la distribuzione di agenti terapeutici in tutto il corpo. Usando sistemi di rilascio specifici, il farmaco viene indirizzato verso uno specifico sito di azione, riducendo così gli effetti collaterali.

Idrogeli a base di chitosano/ β -GP, grazie alle loro proprietà mucoadesive e pH sensibili, sono effettivamente usati per il rilascio di proteine/peptidi, fattori di crescita, farmaci antiinfiammatori, antibiotici e nella terapia genica.

1.3.2 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale è la tecnologia di rimodellamento dell'organismo in vitro in cui vengono isolate le cellule da una sorgente nativa al fine di disporre di numerose cellule che possono essere successivamente seminate su una struttura (scaffold) porosa di forma ed architettura definita. I materiali usati devono essere biocompatibili, non tossici e dotati di opportune proprietà meccaniche. Il β -GP è osteogenico e pertanto è usato per formare idrogeli con il chitosano.

1.3.3 Terapia antitumorale

In accordo con l'organizzazione mondiale della sanità (OMS), il cancro è la principale causa di morte nel mondo. Le terapie principali includono chirurgia, radioterapia e chemioterapia. Tra queste, la chemioterapia è la più utilizzata, non essendo tuttavia in grado di distinguere tra cellule normali e cellule tumorali; inoltre, la maggior parte del farmaco viene rilasciato rapidamente, immediatamente dopo somministrazione, causando alti livelli di farmaco nel corpo seguiti da un altrettanto rapido declino. A causa della breve durata di azione di alcuni farmaci, sono

necessarie frequenti somministrazioni. Per superare questi ostacoli, sistemi di rilascio controllato e localizzato, quali microparticelle, impianti e geli, hanno rimpiazzato la somministrazione sistemica, mostrato innumerevoli effetti benefici nella terapia tumorale.

Il maggior vantaggio degli idrogeli che si degradano dopo lunghi periodi (mesi o addirittura anni), è rappresentato dall'aumento della compliance del paziente, quando frequenti somministrazioni sono necessarie. Ad esempio, quando nel trattamento del glaucoma si ricorre a un intervento di trabeculectomia o intervento “filtrante”, numerosi agenti terapeutici vengono utilizzati per inibire la proliferazione dei fibroblasti, quali il 5-Fluorouracile (5-FU). Poiché l'emivita del 5-FU nella camera anteriore dell'occhio a seguito di somministrazione subcongiuntivale è inferiore alle quattro ore, la terapia post-operatoria richiede frequenti somministrazioni, con conseguente diminuzione della compliance del paziente e aumento del rischio di infezioni.

1.3.3.1 5-Fluorouracile

Il 5-FU è un composto pirimidino-analogo, comunemente usato nel trattamento di molti tumori epiteliali. Agisce interagendo con la fase S del ciclo cellulare, nello specifico è in grado di inibire la Timidilato sintetasi, enzima che permette la trasformazione dell'uracile in timidina. La presenza del fluoro in posizione 5 impedisce all'enzima di slegarsi dal

substrato e di conseguenza si ha la sua inattivazione; ciò provoca una deficienza di timidina necessaria per la sintesi del DNA.

Ha effetti collaterali limitati sulla normale superficie oculare epiteliale e poiché il suo costo non è elevato ed è stabile in soluzione acquosa per almeno tre settimane, è il farmaco di prima scelta nella chemioterapia oculare.

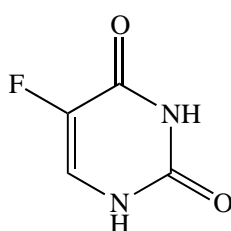


Figura 4: Struttura 5-Fluorouracile

La biodisponibilità del 5-FU nel segmento anteriore dell'occhio è inferiore al 5% rispetto alla dose applicata a causa della lacrimazione e del drenaggio naso-lacrimale. Negli ultimi anni, numerosi studi sono stati svolti per sviluppare nuovi sistemi di rilascio oculare di questo farmaco allo scopo di prolungare il tempo di ritenzione sulla superficie oculare minimizzando la frequenza di somministrazione e aumentandone la penetrazione transcorneale. Tra i numerosi tentativi, una notevole importanza è rivestita da sistemi gelificanti in situ a base di veicoli polimerici, quali il chitosano, che possono essere instillati come normali colliri, ma aumentano il tempo di ritenzione grazie alla loro proprietà gelificante.

1.4 Metodi di preparazione di nanoparticelle di chitosano

Esistono vari metodi per la preparazione di nanoparticelle di chitosano, ma la scelta di una tecnica in particolare deve tenere conto di fattori come la natura del farmaco da incapsulare, il tipo di sistema di rilascio, la via di somministrazione e il sito bersaglio.

Alcuni di questi metodi sono: reticolazione ionotropica, coacervazione complessa, tecniche di emulsione e di microemulsione, auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente.

1.4.1 Reticolazione ionotropica

Questa tecnica si basa sulla formazione di interazioni elettrostatiche tra i gruppi amminici del chitosano e gruppi caricati negativamente di un polianione come il tripolifosfato. È un processo semplice con blande condizioni di preparazione, poiché viene condotto in un mezzo acquoso e non richiede l'impiego di solventi organici. Per prima cosa il chitosano viene solubilizzato in una soluzione acida in presenza o meno di un agente stabilizzante, poi si procede con l'aggiunta del polianione. Le nanoparticelle si formano sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente. Le dimensioni e la carica superficiale delle particelle possono essere modificate variando le proporzioni del chitosano e dell'agente stabilizzante.

Le principali difficoltà che si incontrano con questa tecnica sono la bassa stabilità nel tempo della dispersione colloidale, che può richiedere l'aggiunta di stabilizzanti, e la necessità di usare soluzioni molto diluite, il che può essere un problema quando si vogliono preparare grandi quantità di nanoparticelle.

1.4.2 Coacervazione complessa

La coacervazione complessa si ottiene miscelando due polielettroliti di carica opposta. Si forma un complesso polielettrolitico che si separa in una fase ricca di polimero e una fase molto diluita e va a costituire un film insolubile o una barriera che riveste le particelle.

La coacervazione complessa è una tecnica molto blanda ed efficiente per allestire nanoparticelle, ma è necessario partire da soluzioni molto diluite e controllare il pH durante la preparazione, la purificazione e lo stoccaggio per evitare l'aggregazione. Il peso molecolare e il grado di acetilazione del chitosano, così come la stechiometria della miscela di reazione e l'ordine di aggiunta, possono influenzare la composizione, la carica e la stabilità delle nanoparticelle.

1.4.3 Microemulsione

La microemulsione si ottiene disperdendo una soluzione acquosa di chitosano contenente il farmaco in una fase continua oleosa, costituita da un solvente organico e da un tensioattivo, sotto continua agitazione per

evitare l'intorbidimento. Successivamente si aggiunge un agente reticolante e si fa evaporare il solvente organico. Dalla massa secca ottenuta deve essere eliminato il tensioattivo mediante lavaggio, prima con una soluzione acetone-acqua e poi con acqua distillata, o sciogliendo il pellet in acqua e aggiungendo un sale per far precipitare il tensioattivo; in quest'ultimo caso la soluzione viene dializzata e liofilizzata per ottenere una polvere secca.

Con questo metodo si generano nanoparticelle più piccole di 200 nm con una ridotta distribuzione dimensionale. I maggiori limiti di questo processo sono rappresentati dall'uso di solventi organici, dalla procedura di preparazione e dalla complessità della fase di lavaggio.

1.4.4 Coalescenza di goccioline in emulsione

Questo metodo consiste nel preparare un'emulsione acqua/olio stabile di una soluzione di chitosano in olio di paraffina e una simile utilizzando una soluzione di NaOH come fase acquosa. Miscelando le due emulsioni sotto vigorosa agitazione, le goccioline coalescono e si ha la precipitazione di piccole particelle di chitosano.

Le dimensioni particellari e l'incapsulamento del farmaco sono influenzati dal grado di acetilazione e dal peso molecolare del chitosano e dal tipo di farmaco.

1.4.5 Estrazione del solvente in emulsione

Si prepara un'emulsione olio/acqua, aggiungendo sotto agitazione meccanica un solvente organico parzialmente miscibile in acqua ad una soluzione di chitosano contenente un agente stabilizzante, procedendo poi con un'omogeneizzazione ad alta pressione. L'emulsione viene poi diluita con grandi volumi d'acqua per estrarre il solvente organico. Le nanoparticelle si formano come risultato della diffusione del solvente organico nell'acqua. Questa procedura è adatta a farmaci idrofobici e con essa si raggiunge un'elevata percentuale di farmaco incapsulato.

Gli svantaggi più importanti di questo metodo includono l'uso di solventi organici e l'applicazione di elevate forze di taglio.

1.4.6 Auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente

È possibile ottenere nanoparticelle a base di chitosano anche per modificazione idrofobica di un suo derivato solubile. Con questa tecnica sono state preparate nanoparticelle utilizzando N-palmitoilchitosano: è stato osservato che un grado di sostituzione del 5% di gruppi palmitoilici sullo scheletro del chitosano era sufficiente per consentire la formazione di nanoparticelle, a causa di un significativo aumento delle interazioni idrofobiche intra- e intermolecolari.

1.5 Liofilizzazione di dispersioni nanoparticellari

L'ostacolo maggiore che limita l'uso delle nanoparticelle è dovuto alla loro instabilità fisica (aggregazione/fusione particellare) e/o chimica (idrolisi dei materiali polimerici che costituiscono le nanoparticelle, reattività chimica del farmaco durante la conservazione).

Per aumentare la stabilità fisica e chimica di questi sistemi, l'acqua deve essere rimossa. Il processo comunemente usato in campo farmaceutico per trasformare soluzioni o sospensioni in solidi di sufficiente stabilità è il freeze-drying, processo industriale meglio conosciuto come liofilizzazione. La liofilizzazione permette di rimuovere l'acqua da un campione congelato mediante sublimazione e desorbimento sotto vuoto. Tuttavia, questo processo genera vari stress durante gli step di congelamento ed essiccamento; dunque per proteggere le nanoparticelle dagli stress e dalla seguente aggregazione, spesso si usano crioprotettori. La maggior parte dei crioprotettori sono zuccheri quali mannitolo, sorbitolo, lattosio e trealosio.

Questi zuccheri vetrificano a una specifica temperatura e la loro matrice vetrosa può proteggere le nanoparticelle dallo stress meccanico esercitato dal ghiaccio. In molti studi sui crioprotettori, la più alta concentrazione di crioprotettore corrisponde a una migliore stabilità delle nanoparticelle in termini di aggregazione.

E' generalmente accettato che il crioprotettore forma legami ad idrogeno con le molecole di acqua. Durante la liofilizzazione, il crioprotettore spiazza le molecole di acqua e le nanoparticelle possono essere protette dai cristalli di ghiaccio. Allo stesso tempo, quando le molecole di crioprotettore interagiscono tramite legami idrogeno con le nanoparticelle, si liberano molecole di acqua disponibili per l'evaporazione. Quando la concentrazione del crioprotettore aumenta, l'aggregazione delle nanoparticelle può aumentare o diminuire a seconda del sistema nanoparticellare e delle condizioni di liofilizzazione (*Wassim Abdelwahed et al., 2006*).

Il **trealosio** è il crioprotettore preferibile per le biomolecole.

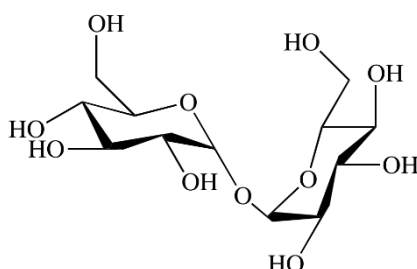


Figura 5: Struttura Trealosio

Ha molti vantaggi rispetto agli altri zuccheri quali minore igroscopicità, assenza di legami ad idrogeno interni che porta ad una maggiore formazione di legami ad idrogeno con le nanoparticelle durante la liofilizzazione, reattività chimica molto bassa, alta temperatura di transizione vetrosa

1.6 Vantaggi del chitosano nella somministrazione oculare

Il tempo di residenza di un farmaco oftalmico per uso topico si riferisce alla durata del contatto con la superficie oculare (*Alonso and Sánchez, 2003*). Quando nella formulazione sono presenti polimeri mucoadesivi la clearance del farmaco è controllata dalla velocità di ricambio del muco, che è molto più lenta di quella del fluido lacrimale. Questa maggiore ritenzione della formulazione farmaceutica, per un farmaco con una buona permeabilità, si traduce in una maggiore biodisponibilità oculare.

Il chitosano rientra nella categoria dei polimeri mucoadesivi, tale proprietà è connessa all'attrazione tra i suoi gruppi amminici, caricati positivamente e i residui di acido sialico del muco che portano una carica negativa. Oltre alla mucoadesività altre interessanti caratteristiche lo rendono il candidato ideale per la somministrazione oculare di farmaci. Aumenta la permeabilità delle cellule epiteliali, sia per via paracellulare sia intracellulare, agendo in modo reversibile senza intaccare la loro vitalità o danneggiare la membrana. È biodegradabile e ciò consente una sicura somministrazione e la successiva degradazione di formulazioni oculari applicate localmente. La sua biodegradazione è mediata dall'azione idrolitica del lisozima e di altri enzimi che producono chito-oligomeri e monomeri. È stato riportato che la velocità del processo in presenza di

lisozima dipende dal grado di acetilazione del polimero, sebbene gli studi abbiano fornito dei risultati contraddittori. Ha un'eccellente tollerabilità oculare, che è stata verificata tramite prove sui conigli dopo applicazione topica di soluzioni di chitosano, ricorrendo alla oftalmoscopia confocale a scansione laser combinata con la colorazione della cornea con fluoresceina (*Felt et al., 1999*). Ha un favorevole comportamento reologico: le sue soluzioni esibiscono proprietà pseudoplastiche e viscoelastiche, essenziali poiché il film lacrimale precorneale ha un carattere pseudoplastico che non deve essere alterato dall'instillazione di preparazioni liquide. In più questo comportamento è particolarmente importante nelle formulazioni oftalmiche perché agevola la ritenzione mentre ne permette la diffusione grazie all'ammiccamento.

Capitolo 2

Parte sperimentale

L'aumento della biodisponibilità oculare dei farmaci rimane una sfida stimolante per i formulatori di sistemi topici. Sistemi gelificanti in situ a base di chitosano e contenenti nanoparticelle medicate possiedono proprietà mucoadesive, antibatteriche, biodegradabili e biocompatibili che li rendono candidati ideali in campo biomedico. Questi sistemi nascono dalla necessità di aggirare gli effetti collaterali locali derivanti da frequenti instillazioni e aumentare la biodisponibilità oculare dei farmaci. Anche se i nanosistemi non hanno la capacità di diffondere negli idrogeli, si può ipotizzare che il gel sulla superficie corneale vada incontro ad un assottigliamento progressivo dovuto al continuo ammiccamento oculare, ciò garantirebbe ai nanosistemi dispersi nel gel di venire in contatto con la superficie corneale.

Il 5-Fluorouracile (5-FU) è il farmaco di scelta nella terapia antitumorale oculare, tuttavia la sua biodisponibilità nell'umore acqueo, che è il sito di azione, è inferiore a 5% della dose applicata.

Le soluzioni termosensibili gelificanti in situ a base di chitosano hanno mostrato di essere capaci di aumentare la biodisponibilità endoculare di 5-FU, grazie alla loro capacità di aumentare il tempo di ritenzione del farmaco nel fluido lacrimale in virtù delle caratteristiche mucoadesive del

polimero (*Nagarwal et al., 2010*). Per questa ragione si è pensato di preparare soluzioni termosensibili gelificanti in situ a base di chitosano e suoi derivati che, come abbiamo dimostrato (*Zambito et al., 2010*), hanno una maggiore mucoadesività rispetto al chitosano progenitore. Nel nostro laboratorio sono stati preparati, nell'ambito di un lavoro di tesi precedente, idrogeli a partire da chitosano commerciale a basso peso molecolare e suoi derivati caratterizzati da gruppi tiolici e da piccole catene laterali formate da gruppi ammonici quaternari adiacenti. E' noto che i residui tiolici presenti sul polimero sono in grado di aumentare la mucoadesività e dunque in teoria il tempo di residenza del sistema terapeutico al sito di assorbimento. In questo lavoro di tesi abbiamo pensato di disperdere, nelle soluzioni di chitosano e suoi derivati, in fase fluida, nanoparticelle medicate con 5-FU.

La considerazione primaria, quando si mira a preparare nanoparticelle polimeriche mucoadesive, è il materiale di base che si suppone sia un polimero mucoadesivo, biocompatibile e biodegradabile. Il chitosano è uno dei materiali indicati a questo scopo.

Lo scopo della presente tesi è quello di caratterizzare sistemi gelificanti in situ contenenti nanoparticelle medicate, concepiti al fine di prolungare il tempo di residenza oculare del farmaco. Pertanto, la presente si è articolata nelle seguenti fasi: 1) preparazione di coniugati chitosano-ammonio quaternario a partire da chitosano a basso peso molecolare; 2) introduzione di gruppi tiolici sui suddetti coniugati per formazione di gruppi ammidici

con acido tioglicolico; 3) preparazione di idrogeli termosensibili usando β -Glicerofosfato (β -GP) come agente gelificante; 4) preparazione di nanoparticelle stabili di adeguate dimensioni per reticolazione ionotropica con acido ialuronico depolimerizzato, che è un polisaccaride polianionico mucoadesivo contenente unità di acido glucuronico; 5) studio delle interazioni farmaco-polimero in fase semisolida; 6) studi di rilascio di 5-FU dagli idrogeli sia in presenza, sia in assenza di nanoparticelle.

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 Materiali

Sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Acido Tioglicolico (TGA) (Sigma);
- 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodimmide cloridrato (EDAC) (Sigma);
- 2-dietilamminoetil cloruro (DEAE-Cl) (Fluka);
- Chitosano a basso peso molecolare (Ch) (Sigma);
- B-Glicerofosfato sale disodico (β -GP) (Sigma)
- Acido Ialuronico (HA) PM 590 kDa (Contipro, Dolní Dobrouč Czech Republic)
- 5-Fluorouracile (5-FU) (Sigma);
- K_2HPO_4 (Carlo Erba);

- Trietilammina (Carlo Erba)
- Membrane di cellulosa, cut-off 12.5 kDa (Sigma)
- Membrane di Nylon 6.6.
- D-(+)-Trealosio diidrato (Sigma)

Prima dell'uso, le membrane di cellulosa e nylon sono state immerse in acqua per almeno 24 ore. Tutte le soluzioni/dispersioni acquose sono state preparate con acqua deionizzata.

2.1.2 Depolimerizzazione di HA

HA (Figura 2.1) a basso peso molecolare (rHA) fu ottenuto per degradazione acida di HA commerciale secondo la procedura descritta da *Shu et al. (2002)*. 1 g di HA fu solubilizzato in 100 mL di acqua, la soluzione fu portata a pH 0.5 con acido cloridrico concentrato e mantenuta per 24 ore a 37°C. Per aggiunta di NaOH 1 M fu poi portata a pH 7 e quindi dializzata contro acqua per 3 giorni. Infine la soluzione fu chiarificata per filtrazione e liofilizzata.

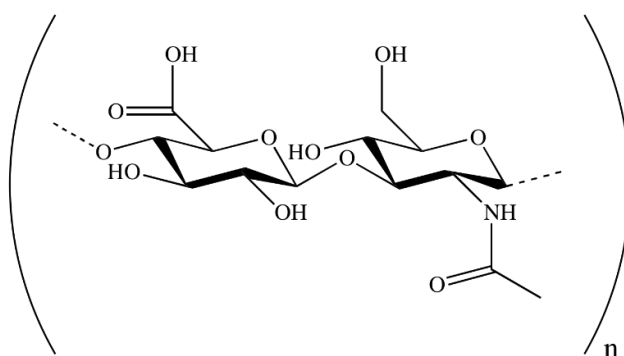


Figura 2.1 : Struttura HA

2.1.3 Determinazione viscosimetrica del peso molecolare di rHA e chitosano commerciale

Il PM medio di rHA fu determinato mediante un viscosimetro a capillare di Ostwald (Cannon-Fenske serie ASTM 75) secondo il procedimento riportato da *Khalid et al.*, (1999). La viscosità ridotta di soluzioni di rHA in NaCl 0.1M, a diverse concentrazioni nell'intervallo 0.1-0.8 mg/mL fu determinata usando l'equazione:

$$\eta_{\text{red}} = (t - t_0) / t_0 C \quad (2.1)$$

dove t e t_0 rappresentano, rispettivamente, il tempo di flusso della soluzione e del solvente, rispettivamente, attraverso il capillare e C è la concentrazione della soluzione espressa in g/mL. Il grafico sperimentale η_{red} vs C era una retta la cui intercetta sulle ordinate a $C=0$ fornì la viscosità intrinseca $[\eta]$, da cui fu calcolato il peso molecolare viscosimetrico del polimero, M_v , espresso in Dalton, mediante l'equazione di Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (2.2)$$

I coefficienti K e α per HA in NaCl 0.1M hanno i seguenti valori:

$$K = 0.0336 \text{ mL/g}$$

$$\alpha = 0.79$$

Usando questi valori e il valore estrapolato di $\eta = 269.3 \text{ mL/g}$ ($r^2 = 0.9523$; $n=5$) nell'equazione 2.2 si ricavò un valore di $M_v = 87 \text{ kDa}$.

In modo analogo a quanto visto per rHA, la viscosità ridotta di soluzioni di Ch, in acido acetico 0.1 M/NaCl 0.2 M, a concentrazioni comprese nell'intervallo 0.1-0.75 mg/mL, fu determinata mediante l'equazione 2.1. I coefficienti K e α per Ch hanno i seguenti valori, determinati da Roberts e Domszy (1982):

$$K = 1.81 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$$

$$\alpha = 0.93.$$

Sostituendo questi valori e il valore estrapolato di 45.1 mL/g per $[\eta]$ ($r^2=0.9898$, $n=5$) il peso molecolare viscosimetrico del chitosano commerciale è risultato essere 524 kDa.

2.1.4 Sintesi dei coniugati N⁺Ch

Grammi 0.5 di Ch furono disciolti in 20 mL di HCl 0.11 M (pH 4.7). Alla soluzione di Ch furono aggiunti in sequenza 2 g di DEAE-Cl HCl e 3 mL di NaOH al 15% sotto vigorosa agitazione alla temperatura di 50 o 60°C. In seguito all'aggiunta della soluzione di NaOH si formò una mucillagine per precipitazione del chitosano. L'agitazione e il riscaldamento furono mantenuti per un tempo di 2 ore, durante le quali il pH fu mantenuto sotto stretto controllo al valore di 8, mantenendo l'elettrodo di un pH-metro immerso nella miscela di reazione ed aggiungendo NaOH acquoso concentrato quando necessario. Dopo completa dissoluzione della mucillagine, la miscela fu portata a pH 7 con HCl 1 M. Quindi fu

chiarificata per filtrazione, dializzata contro acqua per 3 giorni ed infine liofilizzata.

I derivati così sintetizzati vengono indicati con la sigla N⁺Ch50 o N⁺Ch60 a seconda della temperatura di reazione.

2.1.5 Attacco covalente di gruppi tiolici sui derivati N⁺Ch

La tiolazione dei derivati N⁺Ch50 e N⁺Ch60 fu ottenuta per attacco di TGA ai gruppi amminici primari non sostituiti ancora presenti sulle catene di N⁺Ch attraverso la formazione di gruppi ammidici mediata da EDAC (*Kast and Bernkop-Schnürch, 2001*).

EDAC fu aggiunto a 25 mL di una soluzione acquosa limpida di N⁺Ch (2% p/p) fino ad una concentrazione di 50 mM. Dopo la completa dissoluzione di EDAC fu aggiunto un eccesso di TGA (0.8 g) ed il pH fu aggiustato a 5 con NaOH 1 M. La miscela di reazione fu incubata per 3 ore a temperatura ambiente sotto agitazione e quindi sottoposta a dialisi per 3 giorni. La fase esterna della dialisi fu cambiata quotidianamente: il primo giorno era HCl 5 mM; il secondo giorno HCl 5 mM contenente l'1% di NaCl; il terzo giorno HCl 1 mM. Dopo dialisi, la soluzione del polimero fu liofilizzata per ottenere N⁺Ch50SH o N⁺60SH purificati. I derivati tiolati furono conservati a -20°C al buio.

2.1.6 Determinazione del contenuto di gruppi tiolici

Per determinare i gruppi tiolici, 30 mg di ciascun derivato N⁺ChSH50 o N⁺ChSH60 furono disciolti in 20 mL di acqua, a questa soluzione fu aggiunto 1 mL di soluzione di amido all'1% e il pH fu portato a 3 con HCl 1 M. La soluzione fu titolata con una soluzione acquosa di iodio 1mM fino ad una permanente colorazione azzurra (*Kast and Bernkop-Schnürch, 2001*).

Il contenuto di tioli fu espresso come grado di sostituzione (%) per unità di ripetizione del polimero o come μmol per g di polimero.

2.1.7 Preparazione di idrogeli termosensibili

Per preparare idrogeli termosensibili a base di Ch, 500 mg di Ch furono dispersi in 18 mL di una soluzione acquosa di acido cloridrico (HCl) 0.08M. Soluzioni di β -GP furono preparate sciogliendo 380 mg di β -GP in acqua deionizzata. Alla soluzione di Ch, mantenuta sotto agitazione magnetica e raffreddata a 4°C, furono aggiunti goccia a goccia 380 μL della soluzione di β -GP (0.8 g/mL). La soluzione così ottenuta fu posta in una stufa a 35°C.

La medesima procedura fu seguita per preparare idrogeli termosensibili a base di Ch e contenenti il derivato N⁺Ch50 oppure N⁺Ch60 oppure N⁺ChSH50 oppure N⁺ChSH60 in concentrazioni p/v differenti (10, 15 e 20%). Nella Tabella 2.1 è riportato per ciascuna soluzione polimerica

preparata il volume ottimale di β -GP (0,8 mg/mL) necessario affinché la soluzione gelificasse a 35° C.

Tabella 2.1: Caratteristiche delle soluzioni termosensibili gelificanti in situ studiate.

Sigla	Conc. Ch (mg/mL)	Conc. Derivato (mg/mL,%)	β-GP (μL)
Ch	27.8	-	476
N ⁺ Ch60	25	2.8, 10	400
N ⁺ Ch60	23.6	4.2, 15	450
N ⁺ Ch60	22.2	5.6, 20	450
N ⁺ Ch60SH	25	2.8, 10	400
N ⁺ Ch60SH	23.6	4.2, 15	425
N ⁺ Ch60SH	22.2	5.6, 20	550
N ⁺ Ch50	25	2.8, 10	400
N ⁺ Ch50	23.6	4.2, 15	450
N ⁺ Ch50	22.2	5.6, 20	450
N ⁺ Ch50SH	25	2.8, 10	400
N ⁺ Ch50SH	23.6	4.2, 15	450
N ⁺ Ch50SH	22.2	5.6, 20	476

Furono preparati anche idrogeli termosensibili medicati con 5-FU e idrogeli termosensibili contenenti nanoparticelle medicate a base di Ch e derivati. Nel primo caso, il 5-FU (1.25 mg/mL) fu aggiunto alle soluzioni in HCl 0.08 M prima dell'aggiunta di β -GP; nel secondo, prima dell'aggiunta di β -GP dispersioni nanoparticellari liofilizzate, preparate come descritto nel paragrafo 2.1.8, furono aggiunte alle soluzioni in HCl 0.08M.

2.1.8 Preparazione di nanoparticelle medicate con 5-FU

Nanoparticelle a base di chitosano cloridrato medicate con 5-Fluorouracile (5-FU), si formarono spontaneamente sotto graduale aggiunta di porzioni da 100 μ L di una soluzione di un volume di 1.2 mL contenente 1 mg/mL di acido ialuronico e 5.21 mg/mL (6.25 mg) di 5-FU, in acqua deionizzata, a 5 mL di chitosano 0.25 mg/mL in acqua deionizzata. La concentrazione finale del 5-FU nella dispersione nanoparticellare era 1.25 mg/mL. Dopo preparazione, 250 mg di Trealosio furono aggiunti alla dispersione nanoparticellare. Le nanoparticelle così formate furono analizzate dimensionalmente mediante light-scattering (Nano Z690 Malvern).

L'efficienza di intrappolamento (EI) di 5-FU nelle nanoparticelle fu valutata sottoponendo la suddetta dispersione a centrifugazione (19900

rpm, 1h, 4°C) e analizzando il surnatante mediante HPLC come descritto nel paragrafo 2.1.10. L'EI fu espressa come segue:

$$EI = [(M_t - M_s) / M_t] \times 100$$

Dove M_t è la massa totale del farmaco usata per la preparazione e M_s è la massa trovata nel surnatante.

Per ottenere formulazioni stabili e manipolabili, le dispersioni nanoparticellari furono liofilizzate (VirTis adVantage, Congelamento: -35°C , 180 min; essiccamento: 1) -30°C , 360 min; 2) -10°C , 360 min; 3) 10°C , 240 min; 4) 25°C , 180 min). Le dispersioni nanoparticellari furono rigenerate dai rispettivi liofilizzati mediante aggiunta di acqua e blando mescolamento. Il volume di acqua aggiunto fu tale da generare una dispersione isotonica a quella di partenza.

2.1.10 Determinazione HPLC di 5-FU

L'apparato (Perkin-Elmer) era costituito da una pompa Series 200, un iniettore 20 μL Rheodyne, un detector spettrofotometrico UV/vis LC 290 e un software Turbochrom Navigator HPLC per l'integrazione dei dati. Fu utilizzata una colonna Spheri-5 RP 18 $5\mu\text{m}$ 250x4.6 mm. La fase mobile (velocità di flusso 0.6 mL/min) era costituita da KH_2PO_4 0.05M-Trietilammina 0.1%. Il detector UV fu impostato ad una lunghezza d'onda di 266 nm.

2.1.11 Studio delle interazioni farmaco-polimero in fase semisolidi

L'interazione farmaco-polimero in fase semisolidi fu determinata mediante dialisi differenziale. Una membrana non porosa di nylon 6.6 fu montata nell'apparato della dialisi e fu usata per separare la fase idrogel, ottenuto come descritto nel paragrafo 2.1.7, da una fase fluida. Sei celle, ciascuna contenente in una emicella uno strato di idrogel di spessore 0.2 cm (2mL) contenente una concentrazione nota di farmaco (1.25 mg/mL), separato grazie alla membrana da 7 mL di tampone fosfato pH 7.4 0.13M (TF), furono simultaneamente agitate in un bagno scuotitore termostato a 35 °C. La concentrazione iniziale del farmaco in TF era diversa nelle diverse celle ed era compresa in un intervallo nel quale doveva rientrare la concentrazione di equilibrio con il gel (0.0018, 0.0088, 0.044, 0.22, 0.55, 1.1 mg/mL). In ciascuna cella il farmaco tendeva a equilibrarsi tra le due fasi. Dopo un appropriato intervallo di tempo (6 ore), sufficiente a misurare una variazione positiva o negativa della concentrazione in TF rispetto a quella iniziale, tale variazione fu determinata e riportata in grafico in funzione della concentrazione iniziale corrispondente. Il 5-FU fu determinato spettrofotometricamente a $\lambda = 266$ nm.

2.1.12 Studio del rilascio di 5-FU dagli idrogeli, in presenza e in assenza di nanoparticelle

Il rilascio di 5-FU dagli idrogeli fu determinato usando il seguente procedimento. In una cella di teflon furono posti 0.5 mL di gel contenente o meno nanoparticelle medicate e preparato come descritto nel paragrafo 2.1.7. A contatto con il gel fu montata una membrana porosa di cellulosa (cut-off 12.5 kDa) e la cella fu immersa in un becher contenente 30 mL di TF. L'apparato fu agitato in un bagno scuotitore termostato a 35°C per tutta la durata dell'esperimento. A prestabiliti intervalli di tempo, la fase ricevente fu prelevata ed analizzata spettrofotometricamente a $\lambda = 266$ nm al fine di determinare la percentuale di farmaco rilasciata.

2.2 Risultati e discussioni

2.2.1 Sintesi dei coniugati N⁺Ch

La reazione di Ch commerciale ($M_w = 590$ kDa) con DEAE-Cl è stata studiata in passato da *Zambito et al.* (2006, 2008). L'analisi NMR basata su mappe bidimensionali mostrò che i risultanti derivati avevano la struttura di coniugati N⁺Ch, precisamente, N,O-[N,N-dietilamminometil (dietildimetilene ammonio)_n] metil chitosani, contenenti piccole catene pendenti costituite da un piccolo numero di gruppi ammonici quaternari adiacenti, parzialmente sostituiti sulle unità di ripetizione di Ch (*Zambito*

et al., 2006). Il grado di sostituzione (GS) e il numero medio di gruppi ammonici quaternari in ogni piccola catena (n) dipendeva fortemente dal pH della miscela di reazione, che doveva essere strettamente controllato al valore di 8 affinché la reazione di sintesi fosse riproducibile (*Zambito et al.*, 2008).

Nella presente tesi, la reazione fu effettuata a partire da Ch ($M_w = 524$ kDa). I coniugati ottenuti portavano la media di una carica positiva per unità di ripetizione, che è forse la massima possibile per questo tipo di polimeri.

I rispettivi valori di GS e n dei due derivati sono riportati nella Tabella 4.1.

2.2.2 Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N^+Ch

Sul derivato N^+Ch erano ancora presenti significative frazioni di unità di glucosammina non sostituite. Queste unità erano potenzialmente disponibili per l'attacco covalente di gruppi tiolici tramite la formazione di legami ammidici tra il gruppo amminico primario della glucosammina e il gruppo carbossilico del TGA. Durante la purificazione nella fase ricevente della dialisi fu introdotto NaCl, usato per purificare i polimeri tiolati, allo scopo di facilitare l'allontanamento del TGA anionico non reagito e la sua sostituzione con cloruro come controanione di $N^+Ch50SH$ e $N^+Ch650SH$.

Nel corso della dialisi fu mantenuto un pH acido perché l'ossidazione del tiolo a disolfuro è favorita da ambienti neutri/alcalini. Il polimero rimase facilmente solubile in acqua. Il contenuto in tiolo del polimero tiolato rimase virtualmente immutato dopo un anno dalla conservazione allo stato di liofilizzato a -20°C al buio.

2.2.3 Caratterizzazione delle nanoparticelle medicate con 5-FU

Le dimensioni medie delle nanoparticelle, preparate come descritto nel paragrafo 2.1.8 determinate immediatamente dopo la loro preparazione erano sempre comprese nell'intervallo 290-350 nm, come riportato nella Tabella 4.1. In questa tabella sono riportati anche i valori di efficienza di intrappolamento (EI). I dati riportati in Tabella 4.2 indicano che dopo ridispersione dei loro liofilizzati, le dimensioni medie rimasero immutate così come rimase immutato l'indice di polidispersione. L'indice di polidispersione dà informazioni sulla omogeneità della dimensione media delle nanoparticelle, un indice di polidispersione vicino ad 1 indica una elevata disomogeneità delle dimensioni. Come si può osservare dai dati riportati in tabella 4.2, l'indice di polidispersione è in tutti i casi inferiore a 0.45 e questo indica una buona omogeneità del sistema anche dopo liofilizzazione.

Quindi, la presenza di trealosio 5% w/v fu effettivamente in grado di proteggere le nanoparticelle dagli stress esercitati dall'azione dei cristalli

di ghiaccio durante la liofilizzazione senza influenzare l'omogeneità delle loro dimensioni.

2.2.4 Studio delle interazioni farmaco-polimero in fase semisolida

La variazione positiva o negativa della concentrazione del farmaco nelle emicelle contenenti TF, ottenuta mediante la dialisi differenziale, fu riportata in grafico in funzione della concentrazione iniziale corrispondente. Come ci si aspettava, sono state ottenute in tutti i casi delle rette con pendenza negativa, la cui intercetta con l'asse delle ascisse forniva il valore della concentrazione in TF di equilibrio con il gel.

Dai dati riportati in Tabella 4.3, si osserva che in presenza dei derivati N^+Ch e N^+ChSH in miscela con il Ch, la concentrazione di equilibrio era molto più bassa a causa evidentemente di una più forte interazione farmaco-gel. Questa più alta interazione è probabilmente dovuta a un irrigidimento del reticolo polimerico del gel correlato a una maggiore presenza di atomi di azoto quaternari nel reticolo stesso, poiché le interazioni ioniche tra le cariche negative dell'agente gelificante e le cariche positive del chitosano sono le interazioni predominanti nel reticolo polimerico (*J. Berger et al., 2003*).

Tale ipotesi è confermata dal fatto che si è registrata una maggiore interazione farmaco-gel proprio nel caso in cui la presenza del derivato N^+Ch50 in miscela con il Ch era del 20%. Tale polimero, infatti, ha un

rapporto tra atomi di azoto quaternari e terziari superiori agli altri derivati, così come riportato in Tabella 4.1.

2.2.5 Rilascio di 5-FU dagli idrogeli in presenza e in assenza di nanoparticelle

Il rilascio di 5-FU dagli idrogeli, in assenza di nanoparticelle, studiato come descritto nel paragrafo 2.1.12, ha dimostrato come il rilascio del farmaco sia più lento quando la presenza dei derivati N^+Ch e N^+ChSH in miscela con Ch era il 20%.

Dai dati riportati in Tabella 4.4 (a) si osserva che nei casi dei geli contenenti la concentrazione maggiore di derivato N^+Ch50 la % cumulativa di 5-FU rilasciata al tempo $t=120$ min era significativamente più bassa rispetto a tutte le altre formulazioni, in particolare, in presenza del derivato N^+Ch50 , in accordo con i dati ottenuti con la dialisi differenziale discussi nel paragrafo precedente.

Nel caso dei geli contenenti nanoparticelle medicate con 5-FU, la % cumulativa del farmaco rilasciata al tempo $t=300$ min era significativamente più bassa rispetto a quella rilasciata al tempo $t=120$ min dai geli medicati con 5-FU non contenenti nanoparticelle. Questa differenza è particolarmente evidente nel caso dei geli contenenti la concentrazione maggiore del derivato N^+Ch50 , come si può osservare dai dati riportati in Tabella 4.4 (b).

Questi dati sono in accordo con l'ipotesi fatta sopra secondo cui la presenza del 20% del derivato N⁺Ch50 del Ch nella miscela polimerica diminuisce sensibilmente la permeabilità del reticolo polimerico da parte del farmaco.

Capitolo 3

Conclusioni

Si sono ottenuti idrogeli termosensibili a partire da soluzioni di chitosano (Ch) e suoi derivati N^+Ch e N^+ChSH usando β -GP come agente gelificante. Gli idrogeli gelificavano nell'intervallo 30-35 °C e solo in particolari condizioni, cioè, quando il pH delle soluzioni, dopo aggiunta di β -GP era circa 7.

Nanoparticelle di adeguate dimensioni sono state ottenute mediante reticolazione ionotropica del chitosano con acido ialuronico depolimerizzato. Le nanoparticelle erano abbastanza stabili per quanto riguarda le dimensioni, immediatamente dopo la loro preparazione e dopo ridispersione dei rispettivi liofilizzati grazie all'aggiunta di trealosio 5% (w/v).

Studi di interazione farmaco-polimero hanno dimostrato che l'affinità del 5-FU con i componenti della miscela polimerica aumentava all'aumentare della concentrazione dei derivati N^+Ch ed era molto più alta alla massima concentrazione testata.

Il rilascio di 5-FU dagli idrogeli era più lento nel caso degli idrogeli in cui si osservava una maggiore interazione del farmaco con i componenti della miscela polimerica soprattutto quando sono stati introdotti negli idrogeli stessi nanoparticelle medicate con 5-FU.

Questi risultati suggeriscono che idrogeli termosensibili a base di chitosano e suoi derivati contenenti nanoparticelle medicate hanno le caratteristiche sia degli idrogeli sia delle nanoparticelle. Infatti, tali idrogeli, oltre ad essere mucoadesivi, biocompatibili e non tossici possiedono una più lunga durata di azione grazie alla presenza delle nanoparticelle che possono essere indirizzate attivamente o passivamente al desiderato sito bersaglio.

Tali sistemi gelificanti in situ ottenuti a partire da chitosano e suoi derivati contenenti nanoparticelle medicate con 5-FU potrebbero avere le caratteristiche giuste per poter mantenere il 5-FU nel fluido lacrimale per tempi più lunghi rispetto alle gocce tradizionali di fatto aumentando la biodisponibilità del farmaco nell'umore acqueo.

Figure e tabelle

Tabella 4.1: Grado di acetilazione (GA), grado di sostituzione (GS), rapporto tra atomi di azoto quaternari e terziari (n), grado di sostituzione dei gruppi tiolici (GS tioli) e densità di carica positiva (DC)^a. Ciascun valore rappresenta la media di almeno tre preparazioni.

Polimero	GA (%±DS)	GS (%±DS)	n±DS	GS tioli (%±DS)	DC
N ⁺ Ch60	14.9±0.5	59.1±3.1	2.0±0.1	-	1.2
N ⁺ Ch50	14.3±0.5	16.2±0.9	4.7±0.2	-	0.8
N ⁺ Ch60SH				1.1±0.5	
N ⁺ Ch50SH				1.0±0.6	

^a numero di ioni ammonio quaternario per unità di ripetizione

Tabella 4.2: Dimensioni medie delle nanoparticelle determinate immediatamente dopo preparazione e dopo rigenerazione dei loro liofilizzati e relative Efficienze di intrappolamento (sigla, EI).

Dimensioni, nm e PI ± DS preparate di fresco	Dimensioni, nm e PI ± DS dopo rigenerazione dei liofilizzati	EI ± DS
285.6 ± 36.1, 0.420 ± 0.05	341.5 ± 15.2 0.385 ± 0.45	36.6 ± 3.1

Tabella 4.3: Dati relativi agli esperimenti di dialisi differenziale.

Concentrazione iniziale di 5-FU nel gel, 1.25 mg/mL.

Sistema	Concentrazione di equilibrio in TF x 10², mg/mL	r²
Ch	16.1	0.997
N ⁺ Ch60 (10%)	6.1	0.997
N ⁺ Ch60 (15%)	6.5	0.999
N ⁺ Ch60 (20%)	6.7	0.991
N ⁺ Ch60SH (10%)	7.9	0.998
N ⁺ Ch60SH (15%)	6.7	0.999
N ⁺ Ch60SH (20%)	7.1	0.999
N ⁺ Ch50 (10%)	8.5	0.997
N ⁺ Ch50 (15%)	5.5	0.993
N ⁺ Ch50 (20%)	4.6	0.999
N ⁺ Ch50SH (10%)	15.7	0.995
N ⁺ Ch50SH (15%)	12.8	0.993
N ⁺ Ch50SH (20%)	12.9	0.999

Tabella 4.4: Percentuale cumulativa di 5-FU rilasciato (% ril.) al tempo $t=2$ ore (caso dei geli medicati, a) e al tempo $t=5$ ore (caso dei geli contenenti nanoparticelle medicate, b).

a

Sistema	% ril. \pm DS
Ch	83 ± 3.6
N ⁺ Ch60 (10%)	81.7 ± 3.8
N ⁺ Ch60 (15%)	85.3 ± 3.1
N ⁺ Ch60 (20%)	66.0 ± 2.8
N ⁺ Ch60SH (10%)	89.9 ± 2.2
N ⁺ Ch60SH (15%)	79.2 ± 2.5
N ⁺ Ch60SH (20%)	68.0 ± 2.6
N ⁺ Ch50 (10%)	72.2 ± 3.9
N ⁺ Ch50 (15%)	77.7 ± 3.1
N ⁺ Ch50 (20%)	65.1 ± 2.1
N ⁺ Ch50SH (10%)	88 ± 2.0
N ⁺ Ch50SH (15%)	89 ± 2.3
N ⁺ Ch50SH (20%)	63.4 ± 3.6

b

Sistema	% ril. \pm DS
Ch	82.8 ± 4.7
N ⁺ Ch60 (10%)	79.6 ± 3.9
N ⁺ Ch60 (15%)	78.7 ± 3.8
N ⁺ Ch60 (20%)	78.9 ± 0.6
N ⁺ Ch60SH (10%)	82.2 ± 4.2
N ⁺ Ch60SH (15%)	86 ± 3.9
N ⁺ Ch60SH (20%)	76.2 ± 2.9
N ⁺ Ch50 (10%)	84.1 ± 7.6
N ⁺ Ch50 (15%)	69.5 ± 1.5
N ⁺ Ch50 (20%)	59.5 ± 0.9
N ⁺ Ch50SH (10%)	86.5 ± 1.8
N ⁺ Ch50SH (15%)	87.9 ± 2.3
N ⁺ Ch50SH (20%)	78.4 ± 3.8

Figura 6: Frazione di 5-FU rilasciata vs tempo da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch50 (a) e da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch50 contenenti nanoparticelle medicate (b).

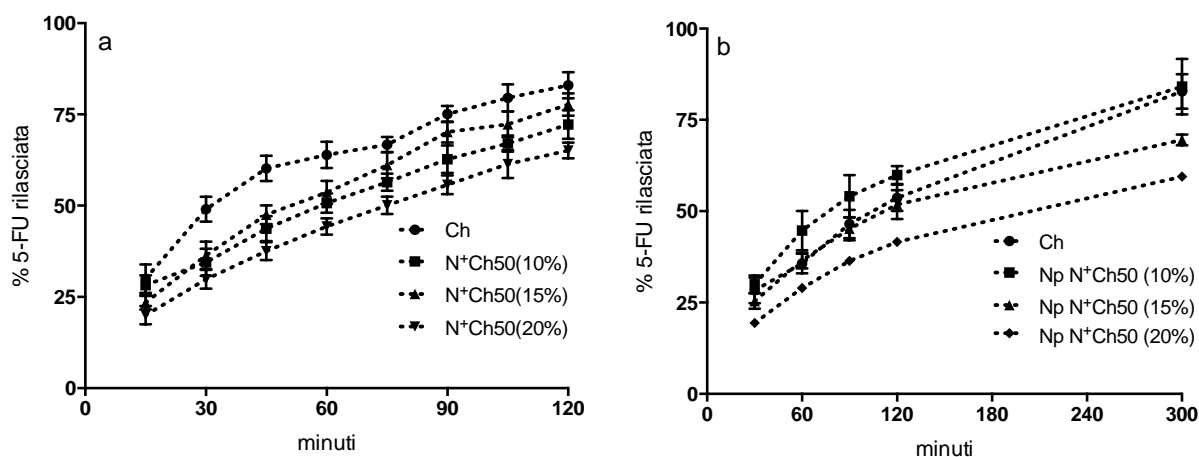


Figura 7: Frazione di 5-FU rilasciata vs tempo da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch60 (a) e da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch60 contenenti nanoparticelle medicate (b).

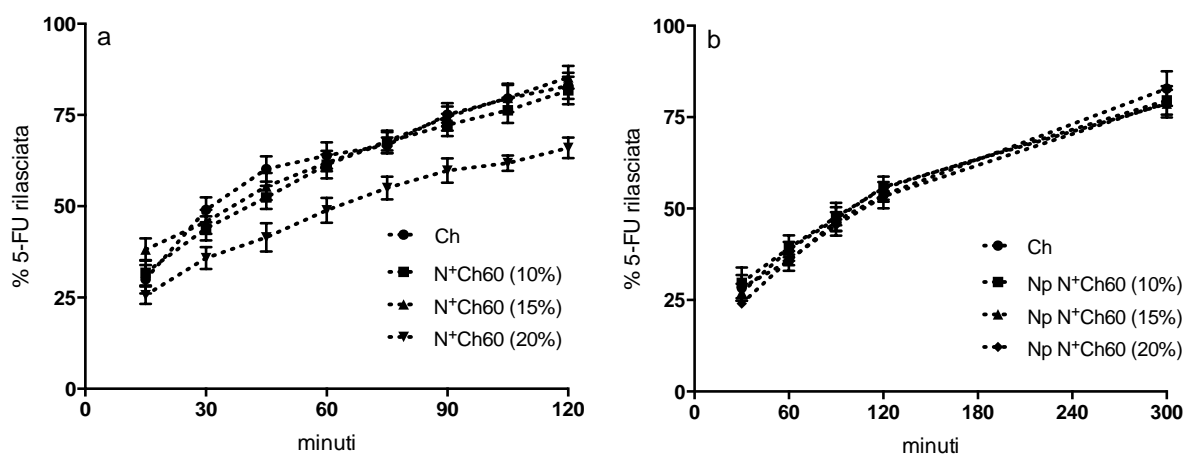


Figura 8: Frazione di 5-FU rilasciata vs tempo da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch50SH (a) e da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch50SH contenenti nanoparticelle medicate (b).

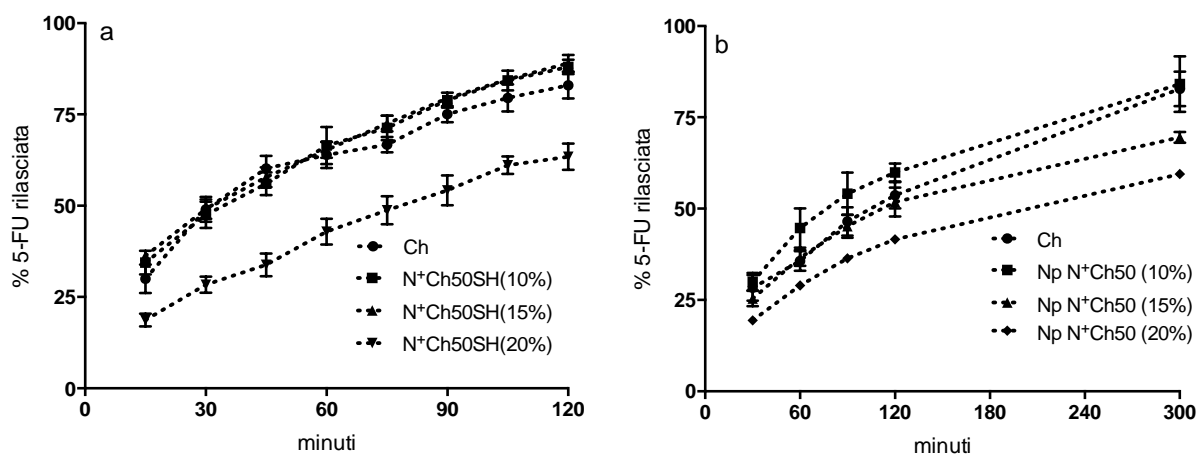
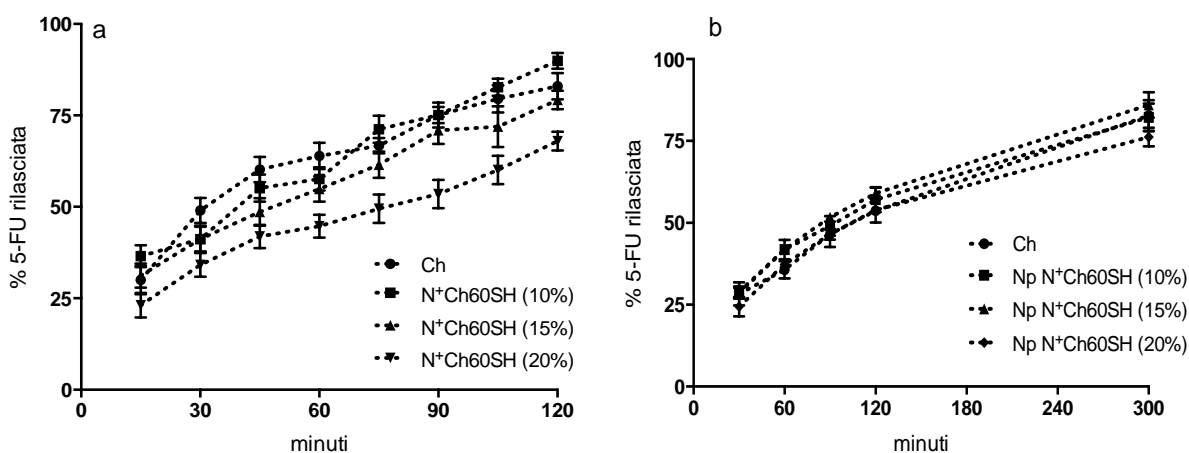


Figura 9: Frazione di 5-FU rilasciata vs tempo da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch60SH (a) e da geli a base di Ch e dei derivati N⁺Ch60SH contenenti nanoparticelle medicate (b).



Bibliografia

- ❖ Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., (2006), Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688-1713.
- ❖ Alonso, M. J., & Sánchez, A. (2003). The potential of chitosan in ocular drug delivery. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55(11), 1451-1463.
- ❖ Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R., (2004), Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.
- ❖ Buschmann, M. D., Filion, D., (2013), Chitosan–glycerol-phosphate (GP) gels release freely diffusible GP and possess titratable fixed charge. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 813-819.
- ❖ Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39-47.

- ❖ Cho, J., Heuzey, M. C., Bégin, A., & Carreau, P. J. (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 500-515.

- ❖ Crompton, K. E., Prankerd, R. J., Paganin, D. M., Scott, T. F., Horne, M. K., Finkelstein, D. I., Gross, K. A., & Forsythe, J. S. (2005). Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels. *Biophysical chemistry*, 117(1), 47-53.

- ❖ Felt, O., Furrer, P., Mayer, J. M., Plazonnet, B., Buri, P., & Gurny, R. (1999). Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International journal of pharmaceutics*, 180(2), 185-193.

- ❖ Kass, M. A., Meltzer, D. W., Gordon, M., Cooper, D., Goldberg, J. (1986), Compliance with Topical Pilocarpine Treatment. *American Journal of Ophthalmology*, 101(5), 515-523.

- ❖ Kast, C. E., & Bernkop-Schnürch, A. (2001). Thiolated polymers—thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan—thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*, 22(17), 2345-2352.

- ❖ Khalid, M. N., Ho, L., Agnely, F., Grossiord, J. L., & Couarraze, G. (1999). Swelling properties and mechanical characterization of a semiinterpenetrating chitosan/polyethylene oxide network: comparison with a chitosan reference gel. *STP pharma sciences*, 9(4), 359-364.

- ❖ Nagarwal, Ramesh C., Singh, P. N., Kant, S., Maiti, P., Pandit, J. K. (2010), Chitosan Coated PLA Nanoparticles for Ophthalmic Delivery: Characterization,*In-Vitro* and *In-Vivo* Study in Rabbit Eye. Journal of Biomedical Nanotechnology, 6(6), 648-647(10).

- ❖ Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Ishikawa, K., Kurita, A., Akaike, T. and Ishihara, M. (2000), Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. J. Biomed. Mater. Res., 49: 289–295.

- ❖ Peniche, H. and Peniche, C. (2011), Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. Polym. Int., 60: 883–889.

- ❖ Roberts, G. A., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. International Journal of Biological Macromolecules,4(6), 374-377.

- ❖ Ruel-Gariepy, E., Chenite, A., Chaput, C., Guirguis, S., & Leroux, J. C. (2000). Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. International journal of pharmaceutics, 203(1), 89-98.

- ❖ Ruel-Gariépy, Eve, and Jean-Christophe Leroux. "In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58.2 (2004): 409-426.

- ❖ Shu, X. Z., Liu, Y., Luo, Y., Roberts, M. C., Prestwich G. D., (2002), Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. Biomacromolecules, 3 (6), 1304–1311.

- ❖ Zambito, Y., Di Colo, G., (2010), Thiolated quaternary ammonium–chitosan conjugates for enhanced precorneal retention, transcorneal permeation and intraocular absorption of dexamethasone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 194-199.

- ❖ Zambito, Y., Uccello-Barretta, G., Zaino, C., Balzano, F., & Di Colo, G. (2006). Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. *European journal of pharmaceutical sciences*, 29(5), 460-469.

- ❖ Zambito, Y., Zaino, C., Uccello-Barretta, G., Balzano, F., & Di Colo, G. (2008). Improved synthesis of quaternary ammonium-chitosan conjugates (N⁺-Ch) for enhanced intestinal drug permeation. *European journal of pharmaceutical sciences*, 33(4), 343-350.